

Caracterización genética de razas de caza: casos aplicados a Mallorca

Amparo MARTÍNEZ¹, José Luís VEGA² y Juan Vicente DELGADO³



SOCIETAT D'HISTÒRIA
NATURAL DE LES BALEARS



Consell de
Mallorca

■ Departament de
Desenvolupament Local

Martínez, A., Vega, J.L. y Delgado, J.V. 2019. Caracterització genètica de razas de caza: casos aplicados a Mallorca. In: Pons, G.X., Barceló, A., Muñoz, M., del Valle, L. i Seguí, B. (editors). Recerca i gestió dins l'àmbit cinègic. Mon. Soc. Hist. Nat. Balears, 28: 115-17. ISBN 978-84-09-11001-8.

La biodiversidad es la variación de la vida en todas sus formas, niveles y combinaciones, incluyendo la diversidad genética, la diversidad en las especies y la diversidad en los ecosistemas. La diversidad genética es un valor que condiciona otros como son la adaptación y la viabilidad de una especie o raza a entornos muy variables y es fundamental a la hora de plantear estrategias de conservación. Cuando se inicia un programa de conservación, las razas a conservar presentan escasos censos, nula estructura y son prácticamente desconocidas desde el punto de vista técnico-científico. Uno de los primeros pasos a seguir es crear las estructuras necesarias para la recogida, clasificación y almacenamiento de información genealógica y morfológica de la población, además de la caracterización genética. Los microsatélites son los marcadores recomendados para la caracterización de la diversidad genética de las razas. En este capítulo se presentan dos ejemplos prácticos del uso de microsatélites en razas autóctonas de Mallorca estrechamente relacionadas con la actividad cinegética: el Boc Balear y el perro Ca Mè Mallorquí. Se estudia la diversidad genética intrarracial e interracial con microsatélites. Se describen los protocolos seguidos para realizar control de filiación y asignación de individuos a poblaciones como herramientas de apoyo a la gestión genética de las mismas. Estas dos poblaciones presentan una diversidad genética moderada-alta, son homogéneas, sin signos de influencias de razas exóticas y con una singularidad que las distingue de las poblaciones más cercanas genéticamente en ambos casos.

Palabras clave: Biodiversidad; Microsatélites; Conservación; Asignación; Probabilidad de Exclusión; Mallorca, Perros, Caprino

CARACTERITZACIÓ GENÈTICA DE RACES DE CAÇA: CASOS APLICATS A MALLORCA. La biodiversitat és la variació de la vida en totes les seves formes, nivells i combinacions, incloent la diversitat genètica, la diversitat en les espècies i la diversitat en els ecosistemes. La diversitat genètica és un valor que condiciona altres com són l'adaptació i la viabilitat d'una espècie o raça a entorns molt variables i és fonamental a l'hora de plantejar estratègies de conservació. Quan s'inicia un programa de conservació, les races a conservar presenten escassos censos, nul·la estructura i són pràcticament desconegudes des del punt de vista tècnic-científic. Un dels primers passos a seguir és crear les estructures necessàries per a la recollida, classificació i emmagatzematge d'informació genealògica i morfològica de la població, a més de la caracterització genètica. Els microsatèl·lits són els marcadors recomanats per a la caracterització de la diversitat genètica de les races. En aquest capítol es presenten dos exemples pràctics de l'ús de microsatèl·lits en races autòctones de Mallorca estretament relacionades amb l'activitat cinegètica: el Boc Balear i el Ca Mè Mallorquí. S'estudia la diversitat genètica intrarracial i interracial amb microsatèl·lits. Es descriuen els protocols seguits per realitzar control de filiació i assignació

d'individus a poblacions com a eines de suport a la gestió genètica de les mateixes. Aquestes dues poblacions presenten una diversitat genètica moderada-alta, són homogènies, sense signes d'influències de races exòtiques i amb una singularitat que les distingeix de les poblacions més properes genèticament en els dos casos.

Paraules clau: Biodiversitat; microsatèl·lits; conservació; assignació; Probabilitat d'Exclusió; Mallorca, Cans, Caprins.

GENETIC CHARACTERIZATION OF HUNTING RACES: CASES APPLIED TO MALLORCA. Biodiversity is the variation of life in all its forms, levels and combinations, including genetic diversity, diversity in species and diversity in ecosystems. Genetic diversity is a value that conditions others such as the adaptation and viability of a species or breed to very variable environments and it is fundamental when considering conservation strategies. When a conservation program is initiated, the breeds to be preserved usually have small censuses, no structure and they are practically unknown from a technical-scientific point of view. One of the first steps to follow is to create the necessary structures for the collection, classification and storage of genealogical and morphological information of the population and finally, the genetic characterization. Microsatellites are the recommended markers for the characterization of the genetic diversity of the breeds. In this chapter, we present two practical examples of the use of microsatellites in autochthonous populations from Mallorca closely related to the hunting activity: the Boc Mallorquí and the Ca Mè Mallorquí dog. Within and between-breed genetic diversity is studied using microsatellites. Protocols for parentage verification and assignment of individuals to populations are described as supporting tools for the genetic management of the breeds. Both populations show moderate-high genetic diversity, are homogeneous, with no signs of admixture with exotic breeds and with a uniqueness that distinguishes them from genetically related populations.

Keywords: Biodiversity; Microsatellites; Conservation; Assignment; Exclusion Probability; Majorca, Dog; Goat.

1 Departamento de Genética, Universidad de Córdoba. Edificio Gregor Mendel, Planta Baja., Campus Universitario de Rabanales, 14071-Córdoba, España. Animal Breeding Consulting SL, Parque Científico Tecnológico de Córdoba c/ Astrónoma Cecilia Payne 8 1. 14014-Córdoba, España. ib2mamaa@uco.es. Autor de correspondencia.

2 Laboratorio de Investigación Aplicada, Servicio de Cría Caballar de las Fuerzas Armadas, Córdoba. España. jvegpla@oc.mde.es.

3 Departamento de Genética, Universidad de Córdoba. Edificio Gregor Mendel, Planta Baja, Campus Universitario de Rabanales, 14071-Córdoba, España. juanviagr218@gmail.com.

Introducción

La domesticación y la concomitante intervención del hombre en la selección animal en un periodo de tiempo relativamente corto han influido lo suficiente para que en la actualidad se encuentren tipos raciales distintos que se utilizan para diferentes actividades. A finales del siglo XIX, con la aparición de las primeras asociaciones de criadores, se empieza a poner de manifiesto el creciente interés en la protección y mejora de las razas de animales. El propósito de estas asociaciones es la definición de modelos raciales teóricos y el diseño de planes de selección animal para conseguir dichos modelos. Para ello es indispensable la identificación y conocimiento de la genealogía de cada individuo, así como la valoración y selección de los reproductores. Los métodos de mejora animal se basan en la selección de reproductores que transmitan unos caracteres productivos muy concretos, lo que a medio o largo plazo implica un aumento de la consanguinidad y, por lo tanto, una mayor homogeneidad genética de la raza. Este fenómeno dificulta cada vez más la

identificación de los individuos y el control de su genealogía, por lo que se requieren marcadores que detecten las cada vez menores variaciones entre los ejemplares de una misma familia, ganadería o grupo racial.

Inicialmente los métodos de identificación y selección se basaban en unos pocos caracteres morfológicos y funcionales, pero cada vez es mayor la necesidad de establecer unos parámetros más objetivos y exactos, que contribuyan no sólo a disminuir los errores y, a veces los fraudes en las asignaciones de paternidades, sino también a conocer mejor la estructura genética de las poblaciones y las relaciones genéticas entre ellas.

En la década de los años 60 del siglo XX aparecen nuevas perspectivas con la posibilidad de estudiar marcadores que no han sido objeto de la selección dirigida por el hombre. A partir de la década de los 80, con la simplificación de las técnicas de investigación del ADN, se precipitan los estudios a nivel molecular apareciendo nuevos marcadores genéticos basados en el estudio de la secuencia del ADN: los marcadores moleculares. Estos marcadores son secuencias de ADN que presentan al menos dos variantes alélicas detectables. La identificación de los alelos paterno y materno de un misma secuencia o *locus* en distintos individuos, permite, en muchas ocasiones, diferenciarlos unos de otros y controlar la filiación de los mismos. También son útiles para el establecimiento de relaciones entre razas mediante el cálculo de distancias genéticas. A su vez pueden ser útiles a la hora de elaborar programas de conservación de la biodiversidad. En algunas ocasiones, y cada vez con más frecuencia, son muy útiles para la selección de reproductores en aquellos casos en los que se han podido establecer relaciones directas entre caracteres de producción o de comportamiento y variantes alélicas determinadas.

Los marcadores moleculares más utilizados en la actualidad son los microsatélites o STR y los polimorfismos de una sola base o SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). Hasta hace pocos años los microsatélites eran los marcadores de elección no solo para la identificación y control de la genealogía, sino también una mejor apreciación y caracterización de la diversidad genética de las razas. Aunque siguen siendo los marcadores recomendados por la International Society of Animal Genetics (ISAG) para verificación de la paternidad, los SNP han cobrado más fuerza en los últimos años y están reemplazado a los microsatélites y los paneles de alta densidad de SNP se utilizan actualmente en estudios de asociación (GWAS), predicción genómica y selección genómica (FAO 2015). En el caso de razas autóctonas en peligro de extinción todavía se siguen utilizando los microsatélites en vez de paneles de SNP debido a que el precio de estos análisis sigue siendo elevado y es difícil que las asociaciones de criadores, normalmente con escasos recursos, puedan asumir el coste de los mismos. Además, muchos de los chips disponibles en la actualidad se han diseñado sin tener en cuenta las razas locales por lo que pueden no detectar correctamente la variabilidad genética de estas razas.

Control de filiación

La forma de herencia de cada microsatélite es codominante, un individuo no puede tener un determinado alelo si éste no está presente en al menos uno de sus progenitores. Cualquier alelo no materno debe proceder del padre, y si el supuesto padre carece de este alelo, no puede ser el verdadero padre. El control de filiación se realiza comparando los genotipos de un panel de marcadores obtenidos en un individuo y los de sus progenitores.

Las pruebas de verificación de la paternidad tienen enfoques distintos en el hombre y los animales, a pesar de usar la misma metodología. En ambos casos la exclusión de un progenitor es cierta al 100% cuando no hay posibilidad de transmisión de un determinado alelo presente en el individuo por parte del supuesto progenitor, aunque se acepta que ante

la posibilidad de una mutación inesperada se debería excluir un progenitor o ambos con más de un marcador. En el caso de los animales, si no se detecta ninguna incompatibilidad en los marcadores analizados, se considera al progenitor como compatible y por lo tanto válido para figurar como tal en los registros genealógicos animales.

Se podría dar el caso de la necesidad de demostrar la fiabilidad del dictamen de compatibilidad. Se trata de algo habitual en los casos de pruebas de paternidad en el hombre en los que la compatibilidad de un padre debe ir acompañada por una probabilidad de paternidad *a posteriori*. Es un cálculo complejo que no suele ser empleado en mundo animal y que se suple con una estrategia que consiste en la selección de una batería de marcadores con una probabilidad de exclusión *a priori* alta en la población a la que pertenecen los progenitores y el individuo en cuestión.

Uno de los primeros planteamientos para hacer pruebas de paternidad fiables, es la necesidad de detectar la mayoría de paternidades falsas que se presenten. Para la evaluación de la capacidad de un marcador de excluir una paternidad falsa se han desarrollado fórmulas dependiendo de la necesidad de excluir un sólo progenitor o los dos.

La eficacia de un sistema genético para dilucidar un test de paternidad, viene determinada por la probabilidad de exclusión (PE) de dicho sistema en una población y está en función del polimorfismo del sistema y de las frecuencias de los alelos que lo componen. La combinación de las probabilidades de exclusión de los diferentes marcadores (PEC), tiene un valor que se utiliza para determinar la eficacia *a priori* de un conjunto marcadores genéticos para resolver casos de paternidad discutible en una población dada. Huguet *et al.*, (1988) definen la probabilidad de exclusión *a priori* (PE) de un marcador genético en una población determinada como la probabilidad de detectar una paternidad falsa en base a ese marcador.

A pesar de disponer de sistemas altamente informativos y con una PE alta para una raza, cuando los progenitores verdaderos y falsos están estrechamente relacionados la PE disminuye enormemente. Así, Malyj (1995) presenta un ejemplo en el que con una batería de 11 microsatélites se alcanza una PE *a priori* de 0,999 en una raza concreta. Cuando calcula la PE para una población formada por familias de medios hermanos su valor disminuye a 0,93. Finalmente, si se plantease una posible exclusión entre cuatro hermanos verdaderos, la PE disminuiría hasta 0,25.

Asignación de individuos a poblaciones

Los marcadores genéticos de ADN ofrecen la posibilidad de utilizar los genotipos individuales para determinar la población de origen de los individuos (Davies *et al.*, 1999). El uso de marcadores microsatélites de ADN combinados con pruebas estadísticas de asignación y métodos similares permiten la detección de cruces entre poblaciones y la comprobación de la homogeneidad intrapoblacional. En las razas caprinas esta herramienta es de gran interés por ser un método probabilístico que permite evaluar la pertenencia de un individuo a una determinada raza. Hoy en día, el estudio del ADN y los análisis estadísticos derivados, son la mejor elección para contrastar las asignaciones preliminares basadas en otros caracteres.

La mejor manera de garantizar la pureza de un animal como requisito previo para la inscripción del mismo en el Libro Genealógico es que éste sea hijo de un padre y una madre inscritos en el Libro. Sin embargo, a veces la genealogía no puede comprobarse porque no se dispone de información sobre los progenitores de dicho animal o bien porque no es posible obtener muestras de los progenitores por lo que no se puede comprobar su genealogía. En estos casos estaría indicado el hacer una asignación del animal que se quiere inscribir en el Libro a la raza ya que, si el resultado indica que el perfil genético del animal

se ajusta al perfil de la raza, éste puede considerarse un animal de raza puro y podría inscribirse en el Libro Genealógico sin que se produzca ningún deterioro genético de la raza por ello. Esta herramienta resulta muy interesante para recuperar animales en razas muy amenazadas.

La asignación es probabilística y puede tener dos enfoques: 1) La muestra problema se asigna a la población en la que su composición genética proporcione una mayor probabilidad, no se excluye la asignación del ejemplar a otras poblaciones, aunque con probabilidades más bajas. 2) Se calcula, para la muestra problema, la probabilidad de que cada una de las poblaciones consideradas en el análisis sea su población de origen, e incluso qué proporción de su genoma tiene origen en cada una de ellas.

En este capítulo se presentarán ejemplos prácticos del uso de microsatélites en razas autóctonas de Mallorca estrechamente relacionados con la actividad cinegética: el Boc Balear o cabra Mallorquina y el perro Ca Mè.

Los estudios realizados son:

1. Caracterización genética:
 - a) Estudio de la diversidad genética intrarracial con microsatélites recomendados por la FAO y la International Society of Animal Genetics (ISAG).
 - b) Estudio de distancias genéticas con otras poblaciones.
 - c) Estudio de la posible subestructura de la población.
2. Control de Filiación y Asignación de individuos a poblaciones como soporte a la gestión de las poblaciones.

Caracterización genética, control de filiación y asignación individual del Boc Mallorquí

La cabra Mallorquina o Boc Balear, es uno de los exponentes más originales de la zootecnia española, debido a su doble perfil ecológico, económico y cultural, como animal productor de carne y a la vez un producto de interés cinegético (Seguí, 2014). El doble componente doméstico-cinegético implica también una doble consideración administrativa de las dos poblaciones, aunque genéticamente tengan la misma base: por un lado, está reconocida oficialmente como raza autóctona en peligro de extinción y así viene reconocida en el Sistema Nacional de Información de razas ARCA (<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/default.aspx>), y por otro lado está reconocida como variedad cinegética en el Decreto 91/2006. Estas peculiaridades obligan a los gestores de la raza a innovar en el diseño de sus programas de gestión genética.

La caracterización genética de esta raza se realizó hace algunos años y los resultados se publicaron en 2005 (Seguí *et al.*, 2005). Desde esa primera caracterización genética se ha continuado trabajando con esta raza debido a la existencia de dos subpoblaciones bien diferenciadas en cuanto a su gestión reproductiva. Por un lado, se cuenta con unos efectivos mantenidos en condiciones domésticas y, por otro lado, un colectivo asilvestrado, base de una actividad económica importante para el sector servicios de Baleares, y con una potencialidad de desarrollo excepcional ya que se trata de animales de interés cinegético internacional de gran prestigio.

El primer reto fue estudiar las relaciones genéticas entre ambas poblaciones, doméstica y asilvestrada, para comprobar si eran genéticamente homogéneas, o si por el contrario se trataba de dos poblaciones distantes desde un punto de vista genético. El estudio con marcadores moleculares mostró una apreciable homogeneidad genética entre ambas poblaciones, pudiéndose considerar un mismo recurso genético criado de dos maneras

diferentes: como raza ganadera y como pieza de caza mayor. En el colectivo doméstico se detectan indicios de los efectos del incremento de la endogamia, justificables por el pequeño tamaño de estos censos domésticos y el aislamiento reproductivo de las explotaciones. Por su parte en la población asilvestrada, se observó que su base mostraba unos niveles de pureza racial muy importante, pero se apreciaba que en los alrededores de las zonas propias de estos animales puros había también presencia de genotipos exóticos que estaban contaminando a la población original, poniendo en peligro la calidad de los trofeos cinegéticos.

Uno de los primeros logros del programa, fue conseguir el acuerdo entre los ganaderos, la asociación de cazadores con perros y lazos y los propietarios de los cotos de caza mayor, para conseguir una gestión coordinada de ambos colectivos que garantizara la conservación de la raza, intentando minimizar la consanguinidad de la población doméstica, y a la vez controlar la pureza de la población asilvestrada, mejorando la calidad de los trofeos.

Para conseguir esto, se puso en marcha un programa de conservación con una serie de objetivos prioritarios. El primero fue realizar un estudio zoométrico para actualizar la caracterización morfológica y genética de la cabra Mallorquina. Hoy se conoce con exactitud la morfología demandada como trofeo para ser utilizada como criterio de selección en la población doméstica. En segundo lugar, se estableció el perfil genético de esta población para ser utilizado como base de la asignación individual a poblaciones como herramienta para luchar contra la hibridación en las poblaciones asilvestradas. Todo el programa se apoya en un exhaustivo control genealógico de las poblaciones domésticas utilizando los análisis moleculares con microsatélites.

Material y métodos

Los detalles de la recogida de muestras, extracción de ADN, microsatélites, PCR y análisis de fragmentos y análisis estadístico están recogidos en la publicación Seguí *et al.* (2005).

En la cabra Mallorquina se utiliza un panel de 20 microsatélites que incluye los 14 recomendados internacionalmente por la ISAG y 6 más recomendados a nivel nacional por el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España para realizar controles de filiación en la especie caprina. Nuestro Laboratorio participa en los Test de Intercomparación que organiza la ISAG y el Laboratorio Central de Veterinaria del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, por lo que utilizamos una nomenclatura estandarizada para la denominación alélica y los resultados obtenidos son válidos tanto a nivel nacional como internacional.

La PE y PEC se ha calculado con el programa informático CERVUS 2.0 (Marshall *et al.*, 1998). Se han amplificado los microsatélites mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los fragmentos obtenidos mediante la PCR se han sometido a una electroforesis en un secuenciador automático ABI3130XL. El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se ha realizado mediante los programas informáticos Genescan Analysis 3.1.2 y Genotyper 2.5 respectivamente utilizando Genescan® 400HD ROX Size Standard como estándar de tamaños.

Los controles de filiación se realizan con un panel de 20 microsatélites con una PEC de 0,99998, lo que significa que con estos marcadores sería posible detectar el 99,998% de los progenitores falsos. Los controles de filiación se hacen mediante comparación directa de las

fórmulas genéticas del individuo con las de sus posibles progenitores mediante un software propio diseñado para tal fin.

La asignación a la raza se ha llevado a cabo utilizando un método no supervisado con el programa Structure v2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Este procedimiento presenta como ventajas más destacables que no requiere especificar las frecuencias alélicas de las poblaciones ancestrales y que permite tener en cuenta situaciones genéticas complejas, incluyendo el caso de muestras que provienen de mezcla entre varias poblaciones. Con este programa se hace un análisis de agrupamiento de los individuos estudiados en un diferente número de clusters (K) que representarían el número de poblaciones asumidas utilizando un modelo de mezcla en el cual cada individuo podría contener en su genoma porcentajes variables de las poblaciones ancestrales de las que proviene.

Esta metodología se ha establecido como un análisis de rutina para aquellos casos en los que es necesario saber si un animal de genealogía desconocida pertenece o no a la población. Esta asignación es fundamental sobre todo en razas muy amenazadas, con escasos censos ya que supone disponer de una herramienta que permita a los responsables del Libro Genealógico tomar decisiones acerca de registrar o no animales con genealogía desconocida o a aquellos en los que se podría sospechar cierto grado de cruzamiento con animales de otras razas. En el caso concreto de la cabra Mallorquina esta herramienta es especialmente útil porque se han detectado en análisis previos algunos animales que, a pesar de poseer todas las características morfológicas propias de la raza, han resultado tener algún grado de cruzamiento al hacer este análisis de asignación.

En el caso de la cabra Mallorquina, para hacer asignación de individuos a poblaciones, se ha considerado que son puros los animales con un coeficiente de mezcla (q) superior a 0,90.

Resultados y discusión

Los resultados de la caracterización genética de la cabra Mallorquina se describieron en Seguí *et al.*, (2005). A partir de estos primeros resultados, se estableció el perfil genético de la raza y se iniciaron los programas de conservación y mejora encaminados a mejorar la gestión de la población utilizando herramientas moleculares como apoyo a dicha gestión.

En estudios posteriores se ha detectado que la cabra Mallorquina presenta una diversidad genética similar a la de otras razas españolas y portuguesas, aunque es una población significativamente desviada del equilibrio Hardy-Weinberg. Presenta un elevado valor de F_{IS} , que indica un exceso significativo de homocigotos probablemente debido a una elevada consanguinidad dentro de la población (Martínez *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2015). La cabra Mallorquina es una de las poblaciones que más contribuye a la diversidad genética caprina en España y Portugal según el estudio realizado por Ginja *et al.*, (2017). La cabra Mallorquina está más relacionada genéticamente con las razas caprinas de la península Ibérica que con las de otras zonas geográficas, y no se han detectado influencias de razas exóticas en la cabra Mallorquina (Sevane *et al.*, 2018). Además es una población genéticamente más homogénea que muchas de las razas de España y Portugal (Martínez *et al.*, 2015).

El problema que se ha encontrado a la hora de hacer el control de la genealogía es la falta de registros en las ganaderías, agravado este hecho en el caso del Boc Balear salvaje, lo que hace que no se puedan realizar estos controles de filiación. En estos casos ha resultado muy útil la asignación de individuos con genealogía desconocida a la raza. Con esta herramienta se han podido detectar animales con diversos grados de cruzamiento con

otras razas y descartarlos como reproductores, y por otro lado rescatar animales con un porcentaje de asignación individual superior al 90 % considerados genéticamente puros.

Caracterización genética, control de filiación y asignación individual del Ca Mè Mallorquí

El Ca Mè Mallorquí constituye uno de los pocos representantes del tronco Bracoide asentados históricamente en España, junto con el Pachón Navarro y el Perdiguero de Burgos. Mantuvo una gran implantación regional en el pasado, que se vio truncada por un aumento de la preferencia por razas internacionales pertenecientes al mismo grupo evolutivo como el Pointer, el Braco Alemán y otras. Esto produjo una erosión genética que llevó a la raza al borde de la extinción, pero gracias al trabajo de un grupo de criadores, el 28 de Diciembre de 2002 se publicó el Estándar Racial y las normas gestoras del Libro Genealógico de la raza en el Boletín Oficial de las Islas Baleares, y posteriormente, en Marzo de 2004, en el Boletín Oficial del Estado por parte del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (Orden APA/807/2004, de 24 de marzo, por la que se actualiza el anexo del R.D. 558/2001, de 25 de mayo). En la actualidad, se estima que existen unos pocos centenares de individuos, de los que tan sólo la mitad se encuentran registrados, por ello el estado de amenaza es una realidad y se necesitan urgentes medidas para su conservación y expansión. Por estos motivos surge la necesidad de implementar un programa de gestión genética dirigido a minimizar la pérdida de la diversidad genética existente, recomendando los apareamientos más oportunos que consigan reducir la consanguinidad y mantener la representatividad de los fundadores, además de facilitar la recuperación de animales externos no registrados apoyándonos en métodos moleculares de adscripción individual al perfil genético de poblaciones.

En este trabajo se presentan los resultados de los estudios de la diversidad genética intrarracial del Ca de Mè Mallorquí así como sus relaciones genéticas con razas de las Islas Baleares y con otras razas caninas. Este estudio tiene como objetivo conocer los niveles de heterocigosis para observar la evolución de los niveles de consanguinidad en esta población sometida a un programa de recuperación. Se estudia también la posible subestructura de la población lo que permitirá diseñar las actuaciones de gestión oportunas.

Material y métodos

Se han analizado 53 muestras pelo de Ca Mè Mallorquí. Para los estudios de diversidad genética inter-racial (diferenciación genética, estructura y distancia genética) se han utilizado además otras 10 razas caninas de la base de datos de ABC (Ca de Bestiar, BES: 78; Ca de Bou, BOU: 47; Ca de Conills de Menorca, CON: 67; Ca Rater Mallorquí, RATER: 12; Ca Eivissenc, POI: 31; Podenco Andaluz, POA: 29; Podenco Canario, POC: 25; Braco, BRA: 14, Pointer, POIN: 26 y Pastor Alemán, PA: 25)

El ADN se ha extraído de muestras de pelo mediante el método de Walsh *et al.*, (1991) y se han amplificado los 21 microsatélites recomendados por la International Society of Animal Genetics (ISAG) para estudios de diversidad canina (ATH121, AHT137, AHTh130, AHTh171, AHTh260, AHTk211, AHTk253, CXX279, FH2054, FH2848, INRA21, INU005, INU030, INU055, REN105L03, REN162C04, REN169D01, REN169O18, REN247M23, REN54P11 y REN64E19).

Tras la amplificación de los 21 microsatélites mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realiza la separación por tamaños de los fragmentos amplificados con una electroforesis en gel de poliacrilamida en un secuenciador automático ABI 3130XL. El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se ha realizado mediante los programas informáticos Genescan Analysis® 3.1.2 y Genotyper® 2.5.2 respectivamente utilizando Genescan® 400HD ROX Size Standard como estándar de tamaños.

Se ha calculado el número medio de alelos por *locus* (MNA), las frecuencias alélicas, la heterocigosis esperada (H_e) y observada (H_o) y el contenido de información polimórfica (PIC) con el programa MICROSATELLITE TOOLKIT software para Excel (Park, 2001). Se ha calculado el número efectivo de alelos con el programa PopGene (Yeh y Boyle, 1997). Los valores de F_{IS} (coeficiente de consanguinidad) con un intervalo de confianza del 95% se han calculado con el programa informático GENETIX v. 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004) y se ha realizado una prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (HW) usando el programa GENEPOP v. 3.1c (Raymond y Rousset, 1995), que aplica el test exacto de Fisher usando el método en cadena de Monte Carlo Markov (Guo y Thompson, 1992) y la corrección de Bonferroni.

Se han calculado los estadísticos F de Wright (Wright, 1969): el coeficiente de consanguinidad F_{IT} (coeficiente de consanguinidad de cada individuo con respecto a la población total), el coeficiente de diferenciación genética F_{ST} (el efecto de las subpoblaciones en comparación con la población total) y F_{IS} (coeficiente de endogamia de cada individuo en relación a la subpoblación a la que pertenece). Estos estadísticos y el Análisis Factorial de Correspondencia se han calculado mediante el programa GENETIX (Belkhir *et al.*, 2003). Se han calculado la distancia genética D_A (Nei *et al.*, 1983) con el programa informático POPULATIONS (Langella, 1999). Con los valores de distancia obtenidos se ha realizado una Neighbor-Net mediante el programa SPLITSTREE (Huson y Bryant, 2006) para representar gráficamente las relaciones genéticas entre las razas.

Se han calculado las distancias genéticas entre individuos D_{SA} (Bowcock *et al.*, 1994) con las que se ha construido un dendrograma utilizando el programa TREEVIEW (Page, 1996). Se ha realizado un análisis de la subestructura del Ca Mè Mallorquí utilizando un algoritmo bayesiano del programa de análisis STRUCTURE v 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000), que emplea un modelo basado en método de cadenas Markov de Monte Carlo para estimar la distribución *a posteriori* del coeficiente de mezcla de cada individuo (q).

Se utiliza el mismo panel de 21 microsatélites empleado en la caracterización genética de la raza. La Probabilidad de Exclusión *a priori* por marcador (PE) y para el conjunto de los marcadores (PEC) se ha calculado con el programa informático CERVUS 2.0 (Marshall *et al.*, 1998).

Los análisis de asignación de los individuos a su población se realizan con el programa Structure v2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Se consideran puros los animales con un coeficiente de asignación individual (q) superior a 0,90.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se recogen los valores obtenidos de los principales parámetros de diversidad genética del Ca Mè Mallorquí. La mayoría de los marcadores son muy informativos ($PIC > 0,5$) siendo medianamente informativos los marcadores INU005 e INU030 (PIC entre 0,25 y 0,50). Tras la corrección de Bonferroni, ningún marcador está desequilibrado en esta población. El marcador INU005 presenta un exceso significativo de

homocigotos ($F_{IS} = 0,355$) y el AHT260 un defecto significativo de homocigotos ($F_{IS} = -0,139$).

Tabla 1. Microsatélites analizados, número de alelos detectados, Número efectivo de alelos (Ae), Heterocigosidades esperada insesgada (He) y observada (Ho), Contenido de Información Polimórfica (PIC), valores de F_{IS} , su intervalo de confianza y las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE).

Table 1. Microsatellites analysed, number of alleles per locus, effective number of alleles (Ae), unbiased Nei's heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), Polymorphic Information Content (PIC), F_{IS} with a 95% confidence interval and Hardy-Weinberg equilibrium deviations.

Microsatélite	Nº Alelos	Ae	He	Ho	PIC	F_{IS}	F_{IS} IC	HWE
AHT137	10	3,64	0,733	0,627	0,700	0,145	(-0,028-0,297)	NS
AHT130	6	3,56	0,729	0,750	0,668	-0,029	(-0,231-0,155)	ND
AHT171	11	6,61	0,859	0,775	0,831	0,099	(-0,047-0,237)	ND
AHT260	7	3,53	0,724	0,824	0,672	-0,139	(-0,259--0,023)	NS
AHTK211	5	3,43	0,715	0,792	0,654	-0,109	(-0,260-0,038)	NS
AHTK253	6	3,63	0,732	0,686	0,684	0,062	(-0,092-0,208)	NS
ATH121	7	4,98	0,807	0,755	0,773	0,065	(-0,065-0,202)	NS
CXX279	7	4,31	0,776	0,736	0,733	0,052	(-0,104-0,210)	NS
FH2054	6	2,79	0,648	0,698	0,599	-0,078	(-0,209-0,046)	NS
FH2848	7	2,81	0,650	0,623	0,598	0,043	(-0,147-0,233)	NS
INRA21	6	2,66	0,630	0,623	0,570	0,011	(-0,197-0,183)	NS
INU005	4	2,31	0,574	0,372	0,491	0,355	(0,112-0,581)	NS
INU030	4	1,74	0,428	0,396	0,372	0,074	(-0,162-0,315)	ND
INU055	6	3,90	0,750	0,755	0,704	-0,006	(-0,153-0,132)	NS
REN105L03	6	2,89	0,660	0,604	0,602	0,085	(-0,101-0,252)	NS
REN162C04	8	4,46	0,784	0,820	0,746	-0,047	(-0,184-0,088)	NS
REN169D01	7	4,53	0,787	0,736	0,745	0,065	(-0,089-0,215)	ND
REN169O18	4	2,43	0,595	0,566	0,501	0,048	(-0,164-0,243)	NS
REN247M23	5	2,67	0,632	0,519	0,550	0,180	(-0,062-0,392)	NS
REN54P11	8	4,92	0,804	0,755	0,768	0,062	(-0,087-0,212)	ND
REN64E19	6	2,63	0,626	0,686	0,545	-0,097	(-0,340-0,127)	NS
Media	6,5	3,54	0,697	0,671	0,643	0,038	(-0,013-0,068)	

NS: No significativo; ND: No determinado.

El promedio de alelos en una población (Tabla 1) indica en cierta manera la variabilidad genética. Este número medio de alelos es moderado-alto (6,5) en el Ca Mè Mallorquí, estando estos resultados apoyados por los valores del número efectivo de alelos (3,54). Este número medio de alelos es inferior al encontrado en Podencos (San José *et al.*, 2018) y en perros de Canarias (Suárez *et al.*, 2013), aunque superiores a los hallados en algunos perros de agua (Méndez *et al.*, 2011) y en el Ca de Bou (Pons y cols., 2016). Los valores de heterocigosidad media esperada ($He=0,697$) y heterocigosidad media por recuento directo ($Ho=0,671$) indican que el Ca Mè Mallorquí muestra una diversidad genética moderada-alta. El valor de F_{IS} con un intervalo de confianza al 95% con 1000 remuestreos es de 0,038 (-0,013-0,068), aunque no es significativo, lo que indica que la población no muestra una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg.

A la vista de los resultados encontrados, se puede concluir que el Ca Mè Mallorquí presenta una moderada-alta diversidad genética intra-racial, con valores de diversidad similares a los encontrados en otras razas caninas españolas (Parra *et al.*, 2008; Méndez *et al.*, 2011) aunque inferiores a los de algunas razas de Canarias (Suárez *et al.*, 2013).

La diferenciación genética entre las 11 poblaciones caninas incluidas en el estudio es elevada, con los siguientes valores de estadísticos F: $F_{IS}=0,018$ (0,002-0,033), $F_{IT}=0,140$ (0,120-0,160) y $F_{ST}=0,124$ (0,111-0,140). Estos valores son esperables debido a que se están comparando razas de diferentes troncos, aunque Parra *et al.*, (2008) encontraron valores similares en perros de caza y Bigi *et al.*, (2015) encontraron valores muy superiores en perros pastores.

En el Análisis Factorial de Correspondencia el eje 1 diferencia las razas Ca de Bou, Ca de Bestiar y Pastor Alemán del resto de las razas del estudio (Fig. 1). En el eje 3 se separa el Ca Mè Mallorquí de resto de las razas. El Ca Mè Mallorquí se posiciona más próximo a las razas Pointer y Braco y se diferencia del resto de las razas de Baleares.

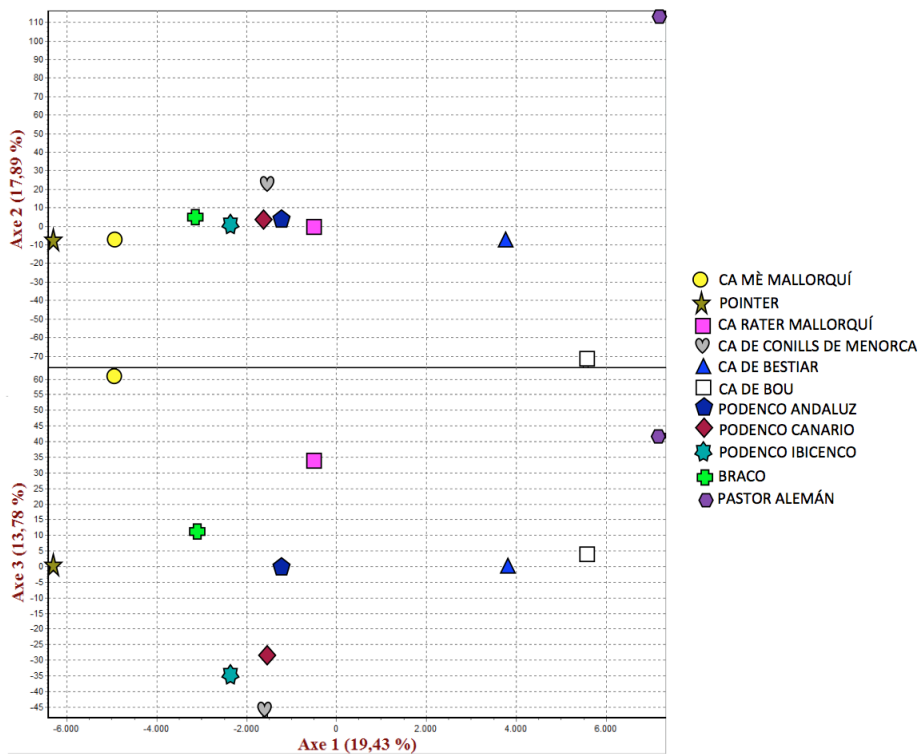


Fig. 1. Análisis Factorial de Correspondencia entre 11 poblaciones caninas.

Fig. 1. Factorial Analyses of Correspondence among 11 dog breeds.

La raza más distante y diferenciada genéticamente del Ca Mè Mallorquí es el Pastor Alemán, mientras que la que menor distancia genética presenta es con el Podenco Andaluz (Tabla 2). En la representación gráfica de las distancias genéticas D_A en un dendrograma en red (Fig. 2) se observan cuatro clústers. El Ca Mè Mallorquí está en el mismo clúster que el Pointer y Braco. El segundo clúster está formado por el Podenco Ibicenco, el Podenco Canario y el Ca de Conills de Menorca. El Ca de Bou y el Ca Bestiar forman un tercer clúster junto con el Pastor Alemán, mientras que el Podenco Andaluz y el Ca Rater forman el cuarto clúster. Se observa en esta gráfica que, al igual que en el Análisis Factorial de Correspondencia, el Ca Mè está más próximo filogenéticamente al Pointer y Braco que al

resto de las razas del estudio, aunque las distancias genéticas entre estas tres razas son grandes.

Tabla 2. Distancias genéticas D_A (debajo de la diagonal) y de F_{ST} (encima de la diagonal) entre pares de poblaciones. ME: Ca Mè Mallorquí, BES: Ca de Bestiar, CON: Ca de Conils de Menorca, RATER: Ca Rater Mallorquí, POI: Ca Eivissenc, POA: Podenco Andaluz, POC: Podenco Canario, BRA: Braco, BRA, POIN: Pointer, PA: Pastor Alemán.

Table 2. D_A pairwise genetic distances (below the diagonal) and F_{ST} (above the diagonal).

	ME	BES	BOU	CON	RATER	POI	POA	POC	BRA	POIN	PA
ME	-	0,120	0,187	0,114	0,095	0,117	0,086	0,123	0,095	0,123	0,212
BES	0,227	-	0,127	0,083	0,084	0,085	0,066	0,102	0,104	0,140	0,163
BOU	0,308	0,214	-	0,165	0,164	0,162	0,146	0,174	0,190	0,233	0,255
CON	0,219	0,163	0,283	-	0,109	0,050	0,049	0,063	0,078	0,114	0,164
RATER	0,231	0,224	0,300	0,268	-	0,128	0,048	0,122	0,104	0,143	0,187
POI	0,231	0,216	0,286	0,129	0,282	-	0,069	0,097	0,114	0,130	0,207
POA	0,171	0,140	0,247	0,135	0,154	0,176	-	0,067	0,058	0,099	0,153
POC	0,241	0,214	0,262	0,150	0,270	0,185	0,151	-	0,108	0,146	0,212
BRA	0,244	0,269	0,359	0,242	0,287	0,284	0,206	0,284	-	0,111	0,201
POIN	0,227	0,279	0,355	0,244	0,297	0,238	0,194	0,261	0,266	-	0,285
PA	0,385	0,291	0,419	0,306	0,367	0,386	0,311	0,372	0,425	0,472	-

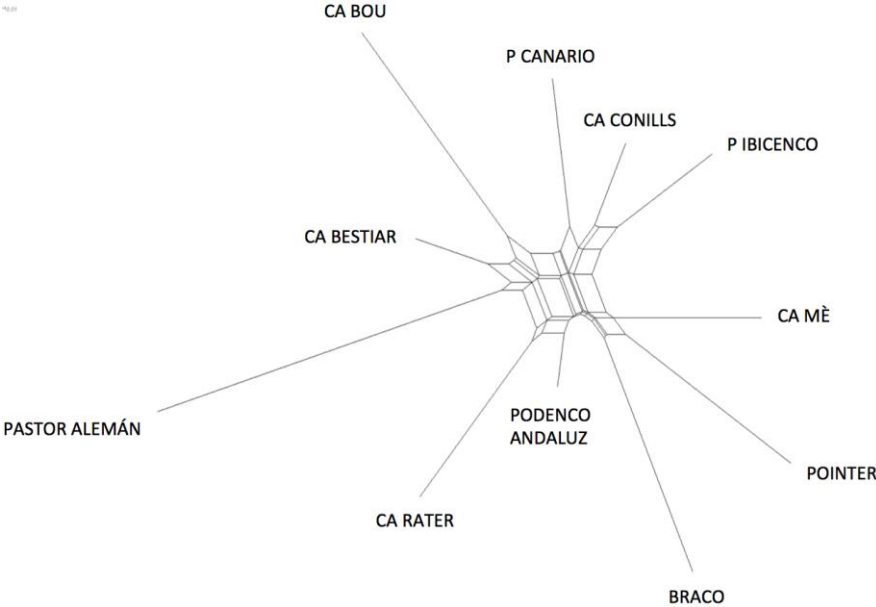


Fig. 2. Neighbor-Net de las distancias genéticas D_A entre 11 poblaciones caninas.

Fig. 2. D_A genetic distances Neighbor-Net among 11 dog populations

Con este estudio se pretenden dos objetivos fundamentales que son, por una parte, conocer si existe una subestructura interna del Ca Mè Mallorquí que debería tenerse en cuenta a la hora de gestionar la raza, y por otra evaluar la eficacia de un sistema objetivo de asignación de individuos a poblaciones.

En un primer análisis de la estructura genética, se construye un árbol de distancias entre individuos (Fig. 3). Este sencillo cálculo los individuos, que se representan con una línea, se agrupan en función de su proximidad genética y sirve para hacer una primera valoración de la homogeneidad de las poblaciones. Casi todos los individuos de Ca Mè Mallorquí (en amarillo) se agrupan juntos, aunque unos pocos se agrupan con individuos de otras razas. Las razas Podenco Ibicenco, Podenco Canario y Pastor Alemán son muy homogéneas, mientras que en otros casos como por ejemplo el Ca de Conills de Menorca o el Ca de Bestiar, se observan varios agrupamientos.

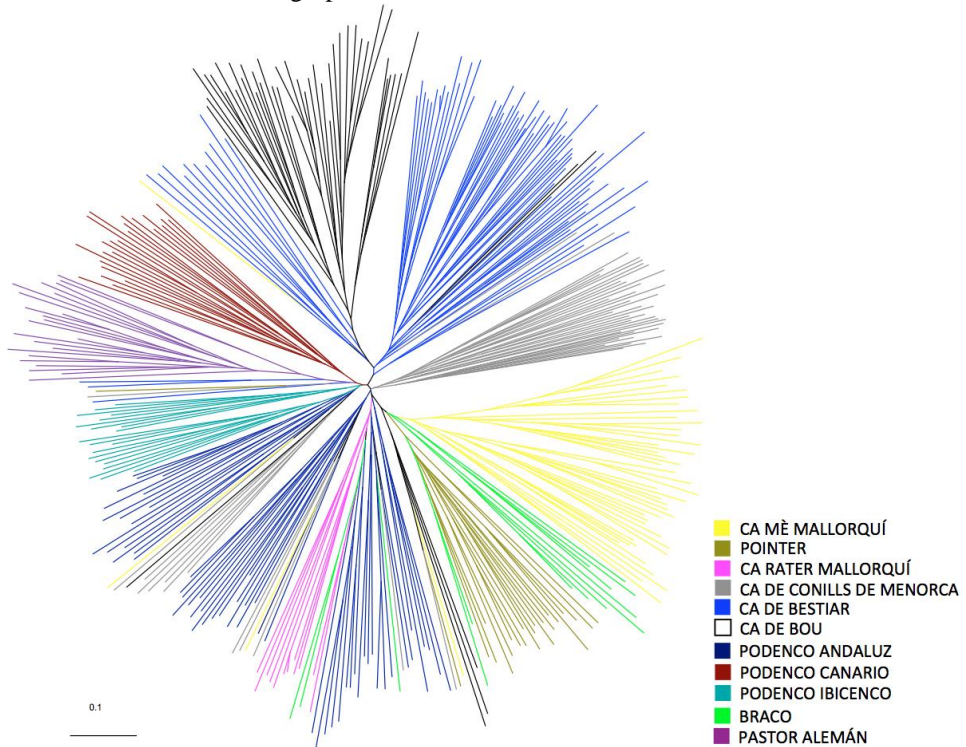


Fig. 3. Árbol de distancias individuales D_{SA} en 11 poblaciones caninas.

Fig. 3. D_{SA} individual distances dendrogram among 11 dog populations

En la Fig. 4 se presenta gráficamente la estructura poblacional de las 11 poblaciones utilizando el programa informático Structure v.2.1. Se ha realizado con 300000 iteraciones de Burn-in y con número de iteraciones de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) de 400000. Cada individuo se representa como una barra vertical y cada color representa la proporción del clúster correspondiente (raza en este caso) en forma proporcional. Cuando el número de poblaciones estimadas es 2 ($K=2$), se separan dos clústers (verde y rojo). El Ca Mè Mallorquí está en el clúster rojo junto con el Ca de Bou, Ca Rater, Braco y Pointer. Cuando $K=4$ el Ca Mè Mallorquí forma un clúster diferente (en amarillo) que permanece así en valores de K superiores. Estadísticamente, el número óptimo de poblaciones es $K=8$, en el que el Ca Mè Mallorquí sigue diferenciándose del resto de las razas analizadas. No se observa subdivisión del Ca Mè Mallorquí en K superiores y desde $K=4$, alrededor del 87% de los individuos analizados se asignan en el mismo clúster, siendo este valor el 85,6% cuando $K=8$ (Tabla 3).

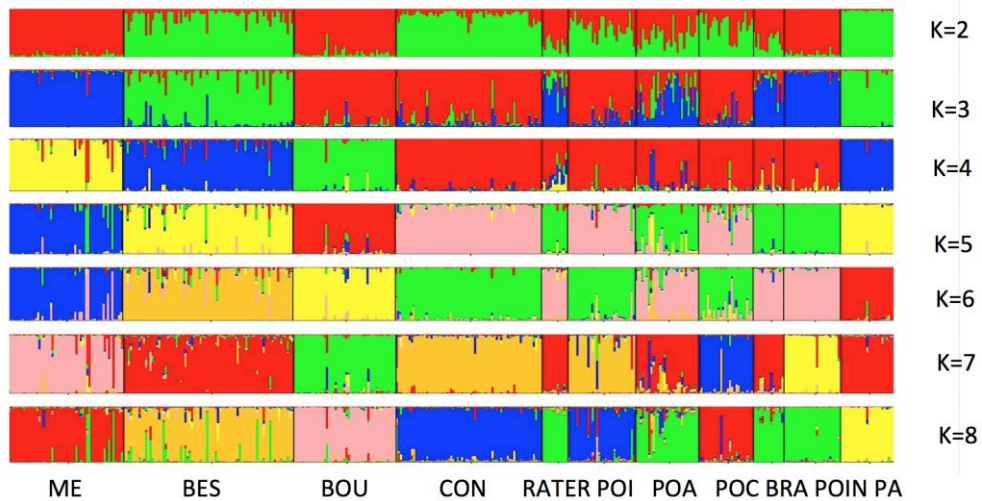


Fig. 4. Estructura genética de las 11 razas caninas analizadas. ME: Ca Mè Mallorquí, BES: Ca de Bestiar, CON: Ca de Conils de Menorca, RATER: Ca Rater Mallorquí, POI: Ca Eivissenc, POA: Podenco Andaluz, POC: Podenco Canario, BRA: Braco, BRA, POIN: Pointer, PA: Pastor Alemán.

Fig. 4. Genetic Structure of the 11 dog breeds analysed. ME: Ca Mè Mallorquí, BES: Ca de Bestiar, CON: Ca de Conils de Menorca, RATER: Ca Rater Mallorquí, POI: Ca Eivissenc, POA: Podenco Andaluz, POC: Podenco Canario, BRA: Braco, BRA, POIN: Pointer, PA: German Shepherd Dog.

Tabla 3. Porcentaje de asignación (Q) de cada población a cada uno de los 8 clústers.

Table 3. Assignment percentage (Q) of each population to 8 clusters.

	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
CA MÈ MALLORQUÍ	0,013	0,018	0,014	0,006	0,010	0,006	0,856	0,077
CA DE BESTIAR	0,019	0,008	0,023	0,028	0,020	0,801	0,014	0,087
CA DE BOU	0,021	0,011	0,007	0,006	0,915	0,012	0,013	0,016
CA DE CONILLS DE MENORCA	0,022	0,014	0,896	0,014	0,007	0,014	0,010	0,022
CA RATER MALLORQUÍ	0,012	0,008	0,005	0,007	0,015	0,011	0,011	0,930
CA EIVISSENC	0,062	0,025	0,824	0,004	0,023	0,007	0,018	0,038
PODenco ANDALUZ	0,066	0,039	0,052	0,013	0,016	0,043	0,018	0,753
PODenco CANARIO	0,889	0,013	0,044	0,006	0,015	0,007	0,015	0,010
BRACO	0,031	0,036	0,022	0,007	0,007	0,005	0,023	0,868
POINTER	0,006	0,920	0,007	0,005	0,006	0,005	0,011	0,040
PASTOR ALEMÁN	0,013	0,003	0,008	0,954	0,004	0,005	0,004	0,008

El Ca Mè Mallorquí es una población homogénea y no se observa subestructura ni mezcla con el resto de las poblaciones estudiadas. No obstante, hay un pequeño grupo de animales que no se ajustan al perfil genético del resto de las muestras analizadas. El Ca Mè Mallorquí se separa en un clúster independiente a partir de K=4, lo que haría posible el realizar asignación de individuos a la raza con altos niveles de fiabilidad. Esta herramienta permite asignar individuos a la población de Ca Mè Mallorquí en aquellos casos en los que se plantea la posibilidad de registrar un animal cuando no se conoce quien es su posible padre ni madre, o bien porque, aunque estos sí se conocen, no se puede comprobar la genealogía con marcadores de ADN porque ya están muertos o ilocalizables y no se puede obtener muestra de ellos. En estos casos, es posible una asignación de individuos a

poblaciones de forma que, si el animal problema se asigna a la población con una probabilidad superior al 90%, este animal se podría inscribir en el Libro Genealógico sin producir un deterioro genético de la raza. Esta misma metodología se emplea en casos forenses lo que demuestra su utilidad y fiabilidad (Berger *et al.*, 2018). Siempre que sea posible, se recomienda verificar la genealogía con microsatélites antes de registrar los animales. El panel utilizado tiene una PEC de 0.99992 que garantiza que es posible detectar un 99,992% de las paternidades falsas.

El Ca Mè Mallorquí tiene una moderada-alta diversidad genética intra-racial, es una población homogénea y no se observa subestructura ni mezcla con el resto de las poblaciones incluidas en este estudio. Está próxima genéticamente a las razas Braco y Pointer, aunque constituye una población diferenciada del resto, lo que permite realizar asignación a la raza con fiabilidad.

Agradecimientos

A la Red CONBIAND (Conservación de la Biodiversidad de los Animales Domésticos para el Desarrollo Rural Sostenible) por los estudios realizados con razas locales lo que ha permitido disponer de amplias bases de datos de estas razas y contribuir a aumentar el conocimiento de las mismas. Al grupo de investigación PAIDI AGR-218 de la Junta de Andalucía por haber hecho posible estos trabajos. A la Fundación Natura Parc, el Serveis de Millora Agraria y Pesquera (SEMILLA) y a la Associació de Ramaders de Cabres de Raça Mallorquina por la financiación de los trabajos de la cabra Mallorquina. Al Departament de Cooperació Local del Consell de Mallorca por la financiación de los estudios del Ca Mè Mallorquí. Al Club de Caçadors i Criadors amb Ca Mè Mallorquí por facilitar la recogida de muestras que han permitido la realización de este estudio y su labor en pro de la conservación de esta raza. A SEMILLA por los trabajos realizados con esta raza encaminados a completar la caracterización morfológica y funcional del Ca Mè Mallorquí.

Referencias citadas

- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. y Bonhomme, F. 2004. *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier (France).*
- Berger, B., Berger, C., Heinrich, J., Niederstätter, H., Hecht, W., Hellmann, A., Rohleder, U., Schleenbecker, U., Morf, N., Freire-Aradas, A., McNevin, D., Phillips, C. y Parsonag, W. 2018. Dog Breed Affiliation with a Forensically Validated Canine STR Set. *Forensic Science International. Genetics* 37: 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.08.005>.
- Bigi, D., Marelli, S. P., Randi, E. y Polli, M. 2015. Genetic Characterization of Four Native Italian Shepherd Dog Breeds and Analysis of Their Relationship to Cosmopolitan Dog Breeds Using Microsatellite Markers. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience* 9 (12): 1921-1928. <https://doi.org/10.1017/S1751731115001561>.
- Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. R. y Cavalli-Sforza, L. L. 1994. High Resolution of Human Evolutionary Trees with Polymorphic Microsatellites. *Nature* 368 (6470): 455-457. <https://doi.org/10.1038/368455a0>.
- Davies, N., Villablanca, F.X. y Roderick, G.K.. 1999. Determining the Source of Individuals: Multilocus Genotyping in Nonequilibrium Population Genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 14 (1): 17-21.

- FAO. 2015. *The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*. Rome: FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments.
- Ginja, C., Cortés, O., Gama, L.T., Delgado, J.V., Amills, M., de Sousa, C.B., Cañón, J., Capote, J., Dunner, S., Ferrando, A., Gómez Carpio, M., Gómez, M., Jordana, J., Landi, V., Manunza, A., Martín-Burriel, I., Pons Barro, A., Rodellar, C., Santos-Silva, F., Sevane, N., Vidal, O., Zaragoza, P. y Martínez, A.M. 2017. Conservation of Goat Populations from Southwestern Europe Based on Molecular Diversity Criteria. En *Sustainable Goat Production in Adverse Environments: Volume I*, editado por João Simões y Carlos Gutiérrez, 509-533. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71855-2_29.
- Guo, S. W. y Thompson, E. A. 1992. Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* 48 (2): 361-372.
- Huguet, Ramia, Angel Carracedo, y Manuel Gene. 1988. *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*. PPU., Barcelona.
- Huson, D.H., y Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254-267.
- Langella, O. 1999. Populations 1.2.31: a population genetic software. CNRS UPR9034. 1999. <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>.
- Malyj, W. 1995. DNA testing in the equine. *Veterinary Clinics of Northern America: Equine Practice* 11: 525-542.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. y Pemberton, J. M. 1998. Statistical Confidence for Likelihood-Based Paternity Inference in Natural Populations. *Molecular Ecology* 7 (5): 639-655.
- Martínez, A.M., Landi, V., Amills, M., Capote, J., Gómez, M., Jordana, J., Ferrando, A., Manunza, A., Martín, D., Pons, A., Vidal, O. y Delgado, J.V. 2011. Biodiversidad caprina en España. *Archivos de Zootecnia* 60 (231): 437-440. <https://doi.org/10.4321/S0004-05922011000300030>.
- Martínez, A.M., Gama, L.T., Delgado, J.V., Cañón, J., Amills, M., de Sousa, C.B., Ginja, C., Zaragoza, P., Manunza, A., Landi, V. y Sevane, N. 2015. The Southwestern Fringe of Europe as an Important Reservoir of Caprine Biodiversity. *Genetics Selection Evolution* 47 (1): 86. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0167-8>.
- Méndez, S., Dunner, S., García, J. A., de Argüello, S., Crespo, M. J., Chomón, N., Calderón, L. A., Sañudo, B. y Cañón, J. 2011. Caracterización del Perro de Agua del Cantábrico. *Archivos de Zootecnia*, 60 (231): 405-408. <https://doi.org/10.4321/S0004-05922011000300022>.
- Nei, M., Tajima, F. y Tatenio, Y. 1983. Accuracy of Estimated Phylogenetic Trees from Molecular Data. II. Gene Frequency Data. *Journal of Molecular Evolution* 19 (2): 153-170.
- Page, R.D. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Park, S D E. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. University of Dublin.
- Parra, D., Méndez, S., Cañón, J. y Dunner, S. 2008. Genetic Differentiation in Pointing Dog Breeds Inferred from Microsatellites and Mitochondrial DNA Sequence. *Animal Genetics* 39 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01658.x>.
- Pons, A., Alanzor, J.M., Delgado, J.V., Gómez, M. M., Landi, V. y Martínez, A. 2016. Caracterización genética del perro de presa mallorquín (Ca de Bou). X Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales. Castelo Branco, Portugal.
- Pritchard, J K, Stephens, M. y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2): 945-959.
- Raymond, M. y Rousset, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86 (3): 248-49.
- San José, C., Cárcel, M.J., Tejedor, M.T. y Monteagudo, L.V. 2018. Microsatellite DNA markers applied to the classification of the Podenco Valenciano canine breed. *Italian Journal of Animal Science* 17 (1): 49-52. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1350119>.
- Seguí, B., Payeras, L., Ramis, D., Martínez, A., Delgado, J.V. y Quiroz, J. 2005. La cabra salvaje mallorquina: origen, genética, morfología, notas ecológicas e implicaciones taxonómicas. *Boll. Soc. Hist. Nat. Balears*, 48: 121-151.

- Seguí, B. 2014. De la ciencia a la gestión aplicada. En Boc Balear, cuatro milenios de historia. Diez años de homologación. Consell de Mallorca, 23-29.
- Sevane, N., O. Cortés, L. T. Gama, A. Martínez, P. Zaragoza, M. Amills, D. O. Bedotti, et al. 2018. Dissection of Ancestral Genetic Contributions to Creole Goat Populations. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience* 12 (10): 2017-26. <https://doi.org/10.1017/S1751731117003627>.
- Suárez, N.M., Betancor, E., Fregel, R. y Pestano, J. 2013. Genetic Characterization, at the Mitochondrial and Nuclear DNA Levels, of Five Canary Island Dog Breeds. *Animal Genetics* 44 (4): 432-441. <https://doi.org/10.1111/age.12024>.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. y Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* 10 (4): 506-13.
- Yeh, F. C. y Boyle. T.J.B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129: 157.